

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

Loora Laan

Rakku sisenevad peptiidid L1 ja L2 plasmiidse DNA transporteritena

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendajad Prof Ülo Langel

MSc Piret Arukuusk

Tartu 2013

Sisukord

Sisukord.....	2
Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus	5
1 Kirjanduse ülevaade	6
1.1 Ühendite rakku transportimise strateegiad	6
1.2 Rakku sisenevad peptiidid	7
1.3 RSP-dega transporditavad ühendid	8
1.3.1 Nukleiinhapete transport RSP-dega.....	9
1.4 RSP-de sisenemismehhanismid	10
1.5 RSP-de toksilisus.....	11
1.6 RSP-de modifitseerimise võimalused.....	11
1.7 Transportaanist NickFectideni.....	12
1.8 Tahke faasi peptiidsüntees.....	13
1.8.1 Sünteesitud peptiidide puhastamine	15
1.8.2 Sünteesitud peptiidide analüüsimine MALDI-TOF massispektromeetriga	15
2 Eksperimentaalne osa	17
2.1 Töö eesmärgid	17
2.2 Materjal ja metoodika	18
2.2.1 Peptiidide süntees	18
2.2.2 Kasutatud rakuliinid	19
2.2.3 Peptiid/plasmiid komplekside moodustamine	19
2.2.4 Komplekside transfektsioon rakukultuuri	19
2.2.5 Tsütotoksilisus.....	20
2.3 Tulemused ja arutelu	21
Kokkuvõte	26
Summary.....	27
Kasutatud kirjanduse loetelu	28

Kasutatud lühendid

ACN	atseetonitriil
Bzl	bensüülrühm
CHCA	α -tsüaano-4-hüdroksükaneel hape
CPP	<i>cell-penetrating peptide</i> , rakku sisenev peptiid
CR	<i>charge ratio</i> , laengu suhe
DCM	diklorometaan
DIEA	N, N-diisopropüületüülamiin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	N, N-dimetüülformamiid
Fmoc	9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül rühm
Glu, G	glutamiinhape
HBTU	N-[1H-Bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat
HeLa	inimese emakakaelavähi rakud
HOBt	1-hüdroksübensotriasool
MALDI-TOF MS	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry</i> , maatriks abistatud laserdesorptsioonionisatsioon-lennuaja massispektromeetria
MBHA	4-metüülbenshüdrüülamiin
MEF	<i>mouse embryonic fibroblast</i> , hiire embrüonaalsed fibroblastid
MSP	mitokondrisse sisenev peptiid
NF	NickFect
pAntp	pAntennapedia
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , fosfaatpuhvriga soolalahus
pDNA	plasmiidne DNA
PF	PepFect
PI	propiidiumiodiid
RLU	<i>relative luminescence unit</i> , suhteline luminesstents ühik
RP-HPLC	<i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i> , pöördfaas vedelikkromatograafia
RSP	rakku sisenev peptiid
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> , tahke faasi peptiidisüntees
t-Boc	tert-Butüüloksükarbonüül rühm

t-Bu	tert-Butüül rühm
TFA	trifluoroatseethape
Thr, T	treoniin
TIS	triisopropüülsilaan
TP10	Transportaan 10
Tyr, Y	türosiin
UT	<i>untreated</i> , töötlemata rakud

Sissejuhatus

Haigusseisundite parandamiseks või hindamiseks kasutatavate ühendite (näiteks valkude, nukleiinhapete, ravimite, kudesid visualiseerivate molekulide) transport rakku on piiratud nii nende molekulide füsiokeemiliste omaduste kui ka raku hüdrofoobse lipiidsest kaksikkihist koosneva plasmamembraani tõttu. Seetõttu vajavad terapeutilised ühendid rakku jõudmiseks transportvektorite abi.

Transpordiks on välja töötatud erinevaid viirustel põhinevaid ja mitteviiruslikke transpordistrateegiaid, millest viimate seast omavad tulevikuperspektiivi ka rakku sisenevad peptiidid (RSP-d). Praeguseks on kindlaks tehtud üle 100 erineva RSP (Ziegler, 2008), mille hulgas on nii looduslikke, sünteetilisi kui ka kimäärseid järjestusi (Lindgren ja Langel, 2011). Lisaks sellele disainitakse pidevalt uusi ja modifitseeritakse juba teadaolevaid RSP-sid, et muuta ühendite transport veelgi tõhusamaks.

RSP-sid saaks rakendada kandjavektoritena haiguste ravis kasutatavate ühendite jaoks, seetõttu tuleb nende väljatöötamisel kontrollida nii transfektsiooniefektiivsust kui ka veenduda ohutuses. Eelmainitud omaduste uurimiseks on transfekteerimisel võimalik kasutada reporterplasmide (*plasmid display*) (Gao jt, 2010).

Erinevate RSP-de seast on kasutatud plasmiidse DNA kandjana ka Transportaan 10-ne (TP10-ne) stearüülimisel saadud derivaati PepFect3-e (PF3-e) ning antud RSP omab võrreldes TP10-ga suurenenud transfektsiooniefektiivsust (Lehto jt, 2011). Seetõttu on PF3 võetud aluseks paljude uute RSP-de disainimisel. PF3-st on edasi arendatud mitmeid NickFectide (NF) perekonda kuuluvaid peptiide, mida on edukalt rakendatud nii spleissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (Oskolkov jt, 2011), siRNA-de kui ka pDNA-de (Arukuusk, 2013) rakku viimisel.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on sünteesida tahke faasi peptiidsünteesi (SPPS) meetodil uued NF1 ja NF2 analoogid L1 ja L2 ja uurida nende efektiivsust plasmiidse DNA (pDNA) kandjavektoritena. L1 ja L2 järjestused erinevad NF1-st ja NF2-st selle poolest, et fosfaatrühm ja seda kandnud aminohape on asendatud glutamiinhappega. Kuna see on ainus muutus, on võimalik hinnata, kas antud peptiidide penetreerumisvõime on seotud järjestuses fosfaatrühma olemasoluga või täiendava negatiivse lisalaenguga. Antud uurimustöö viiakse läbi Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi molekulaarse biotehnoloogia laboris.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Ühendite rakku transportimise strateegiad

Geneetilise materjali või potentsiaalsete terapeutiliste ravimite kohaletoimetamine organismi muudab võimalikuks pärilike ja elu jooksul omandatud haigusseisundite ravi. Toime avaldumiseks tuleb terapeutilised molekulid viia rakkudesse, kuid oma füsiokeemiliste omaduste tõttu ei läbi nad enamasti plasmamembraani ega jõua toimekohani (Ezzat, 2010). Lisaks muudavad suurte ja laenguga ühendite transportimise raskeks mitmed bioloogilised barjäärid. Esiteks, rakku transporditavad ained peavad läbima plasmamembraani ning tuuma viidavad ühendid ka tuumamembraani. Teiseks tuleb vältida lastmolekulide lagundamist rakuensüümide poolt. Nendest takistustest ülesaamiseks on ühendite rakku transportimiseks välja töötatud mitmeid viirusvektoreid ja mitteviiruslikke transpordistrateegiaid. (Al-Dosari ja Gao, 2009) Kõikidel neil strateegiatel on arvukalt eeliseid, aga ka kasutamist piiravaid puudusi. Puudusi püütakse meetodite täiustamisega kõrvaldada, et tagada tulevikus ohutu ja efektiivne bioaktiivsete ainete transport haiguste raviks.

Erinevatest transpordiviisidest on kõige efektiivsem viirusvektoritel põhinev meetod, mis tagab kauakestva geeniekspressiooni ja kõrge transfektsioonitaseme. Samas on viirustel põhinevatel vektoritel ka arvukalt puudusi. Näiteks on kliinilised katsed näidanud, et viirusvektorite kasutamisel võib tekkida äge immuunvastus ja on oht insertiooniliseks mutageneesiks sihtmärkorganismis. Mõlemad viirusvektorite poolt esilekutsutud seisundid võivad organismile mõjuda letaalselt. Lisaks piirab viirusvektorite rakendamist nende tootmise keerulisus ja piiratud viiruse genoomi sisestatava geneetilise materjali suurus. (Gao jt, 2007)

Viirusvektorite ohutumaks alternatiiviks on mitteviiruslikud transportstrateegiaid, mis jagunevad füüsikalisteks ja keemilisteks meetoditeks. Füüsikaliste transfektsioonimeetodite puhul toimetatakse ühendid rakkudesse pisisüsti, elektroporatsiooni, geenipüssi jne abil. Füüsikaliste meetodite peamiseks puudusteks on madal *in vivo* efektiivsus, kõrge hind ja spetsiaalse aparatuuri olemasolu vajadus (Mehier-Humbert ja Guy, 2005). Keemilistest transpordimeetoditest on ainete kohaletoimetamiseks välja arendatud efektiivseid sünteetilisi ja looduslikke kandjaid, näiteks katioonseid lipiide, katioonseid polümeere ja rakku sisenevaid peptiide (RSP-sid). Keemilised kandjad on reeglina ohutumad kui viirusvektorid, kuna ei tekita ise mutatsioone, kuid võivad samuti esile kutsuda immuunvastuse. (Gao jt, 2007)

1.2 Rakku sisenevad peptiidid

Osad looduses esinevatest valkudest omavad võimet läbida rakumembraane. Neist valkudest lühikeste rakus liikumise eest vastutavate järjestuste eraldamisest sai alguse rakku sisenevatel peptiididel (RSP-del) põhinev transpordistrateegia (Ezzat jt, 2010). Esimesena suudeti näidata keemiliselt sünteesitud 86-st aminohappest koosneva rekombinantse Tat valgu võimet liikuda läbi rakumembraani ja translokeeruda tuuma (Frankel ja Pabo, 1988). Seejärel demonstreeriti närvirakkudesse sisse võetavat 60 aminohappe pikkust äädikakärbsse (*Drosophila melanogaster*) antennapedia homeodomääni (Joliot jt, 1991). Antud homeodomäänist eraldati 1994. aastal esimene RSP, milleks oli 16-st aminohappest koosnev pAntennapedia (pAntp), mis tänapäeval omab ka nime penetratiin (Derossi jt, 1994). Esimese RSP avastamine viis omakorda transportaani (TP) (Pooga jt, 1998), oligoarginiini (Wender jt, 2000) ja paljude uute RSP-de väljatöötamiseni, seda nii identifitseeritud peptiidide modifitseerimise kui ka uute disainimise läbi.

Praeguseks on kirjeldatud juba üle 100 RSP (Ziegler, 2008) ning looduslikest valkudest eraldatud RSP-de (nt penetratiin) kõrvale on disainitud ka sünteetilisi (nt oligoarginiin) ja kimäärsed järjestusi (nt TP10). Kimäärsed peptiidid koosnevad nii tehislikest osadest kui ka looduses esinevatest järjestustest, samas kui sünteetilised peptiidid on täiesti tehnilikud (Lindgren ja Langel, 2011). Lisaks eelmainitud RSP-de jagunemisele kolme rühma päritolu alusel (naturaalsed, sünteetilised ja kimäärsed) kasutatakse ka 2008. aastal Ziegleri poolt välja pakutud jaotust, mis lähtub peptiidi aminohappelisest järjestusest ja seostumisest plasmamembraaniga. Antud klassifikatsiooni alusel grupeeruvad RSP-d kolme klassi: primaarsed amfipaatsed, sekundaarsed amfipaatsed või mitteamfipaatsed. Primaarsed amfipaatsed RSP-d (nt TP10) koosnevad järjestikku paiknevatest hüdrofoobsetest ja katioonsetest domäänidest ning olles tüüpiliselt üle 20 aminohappe pikad, ulatuvad plasmamembraani sisemusse. Sekundaarsed amfipaatsed RSP-d (nt penetratiin) on primaarsetest lühemad ja nende amfipaadne iseloom väljendub sekundaarstruktuurides alfaheeliksi või beeta-lehe konformatsioonide tekkimisel membraanis paiknevate lipiididega interakteerumisel. Mitteamfipaatsed RSP-d (nt oligoarginiin) on tavaliselt kõige lühemad ja nende järjestuses on valdavalt katioonsed aminohapped, seetõttu seonduvad nad ka ülekaalus anioonseid lipiide sisaldavatele membraanidele. (Ziegler, 2008)

RSP-d on enamasti kuni 30 aminohappest koosnevad katioonsed ja/või amfipaatsed järjestused (Ezzat jt, 2010) ning on märkimisväärne, et enamus RSP-d sisaldavad füsioloogilise pH juures positiivselt laetud aminohappeid ligikaudu vahemikus 17 kuni 100% (nt polüarginiinid) (Mueller jt, 2008). RSP-de tähtsus seisneb selles, et nad on tõhusad *in vitro*

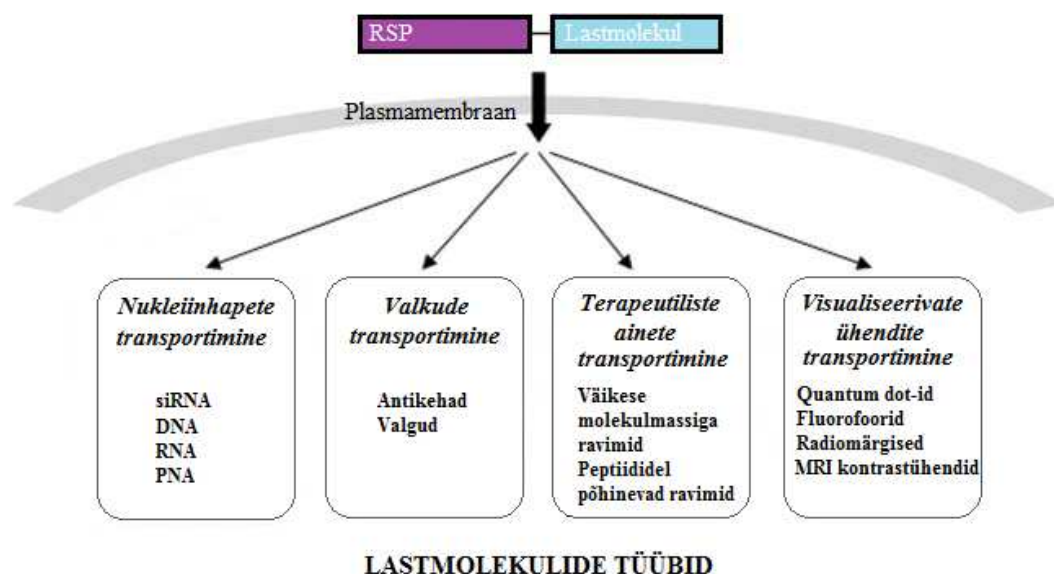
ja *in vivo* transfektsioonireagendid, mis on võimelised transportima rakkudesse biomolekule, mis ei suudaks iseseisvalt liikuda üle hüdrofoobse plasmamembraani. Lisaks sellele aitavad RSP-d säilitada ühendite bioloogilise aktiivsuse ka rakus. (Fonseca jt, 2009) Ainukesed vektorid, mis on võrreldavad RSP-de *in vivo* efektiivsusega, on viirusvektorid (Järver ja Langel, 2004), kuid just ohutuse seisukohalt on RSP-d eelistatavad.

1.3 RSP-dega transporditavad ühendid

Tänapäeval on kasvav vajadus transportvektorite järele, mis viiksid rakkudesse erineval otstarbel kasutatavaid ühendeid. Enamik olemasolevaid vektoreid on kas ohutud, kuid mitte piisavalt tõhusad, või vastupidi. RSP-d on aga makromolekulide transportimisel ilmutanud kõrget efektiivsust ja madalat toksilisust, seda nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsetes (Fonseca jt, 2009). Lisaks viitavad edukad *in vivo* katsed, et RSP-d omavad suurt terapeutilist potentsiaali erinevate inimestel esinevate haiguste ravis (Mäe ja Langel, 2006).

Eesmärgiga uurida, diagnoosida ja ravida haiguseid, on praeguseks RSP-sid rakendatud varieeruva suurusega ühendite rakku viimiseks. Transporditavate biomolekulide hulka kuuluvad bioloogiliselt aktiivsed valgud, nukleiinhapped, kudesid visualiseerivad ühendid ja teised raviotstarbel välja töötatud ained (joonis 1). (Stewart jt, 2008) Näiteks on kasutatud penetratiini, et transportida p53-st eraldatud PNC-28 peptiid rakkudesse kasvaja arengu blokeerimiseks ja kasvaja supressorvalgu p53 funktsiooni taastamiseks (Michl jt, 2006). Peale selle on näidatud, et penetratiini segu insuliiniga parandab insuliini imendumist soolest (Kamei jt, 2008). Terapeutiliste ühendite transportimisel rakendatud RSP-de näiteid on veel teisi.

Eelmainitud lastmolekulide transportimiseks seotakse nad RSP-dega nii kovalentsete sidemete kaudu, kui ka mittekovalentsete interaktsioonide abil. Eelistatum on neist mittekovalentne strateegia, kuna kovalentsete komplekside loomine on aeganõudvam ja kulukam. Mittekovalentne strateegia võimaldab seevastu komplekse tekitada lihtsalt kahe ühendi kokkusegamisel ja vähendab tõenäosust, et RSP häirib lastmolekuli bioaktiivsust. (Heitz jt, 2009)



Joonis 1. RSP-ga rakkudesse transporditavad ühendid (Stewart, 2008)

1.3.1 Nukleiinhapete transport RSP-dega

Nukleiinhapped võimaldavad paljude haiguste ravi, kuid negatiivse laengu tõttu läbivad nad eukariootsete rakkude plasmamembraani madala efektiivsusega. Lisaks on nukleiinhapped plasmamembraani läbimisel vastuvõtlikud nukleaside vahendatud lagundamisele ning ei jõua seetõttu oma toimimiskohta, tuuma. (Al-Dosari ja Gao, 2009). Seetõttu on nukleiinhapete rakkudesse transportimiseks vaja kasutada kandjavektorite abi.

Rakku siseneva peptiidi pAntp vahendusel *antisense* oligonukleotiidide rakkudesse toimetamisega demonstreeriti esmakordselt, et RSP-d on võimelised lisaks valkudele efektiivselt kandma ka nukleiinhappeid (Allinquant jt, 1995). Antud läbimurre oli oluline edasimineku nukleiinhapete kasutamises ravimikandidaatidena. Lisaks seisnes *antisense* tehnoloogia olulisus võimes inhibeerida peaaegu iga soovitud geeni ekspressiooni. Praeguseks on seda üritatud saavutada RSP-de ja oligonukleotiidide konstruktide abil mitmete geenide puhul (Järver ja Langel, 2004).

Peale selle rakendatakse RSP-sid ka lühikeste üheaahelaliste splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SKO-de), kaheaahelaliste geene vaigistavate siRNA-de, plasmiidsete DNA-de (pDNA-de) jne transportimiseks (Ezzat jt, 2010). pDNA-ga transfekteeerimise eesmärgiks võib olla funktsionaalse geeni, mida organism ei ole võimeline ise tootma, rakku viimine. Samuti võimaldavad reportergeeni sisaldavad pDNA-d kontrollida RSP-de transfektsiooniefektiivsust (*plasmid display*) (Gao jt, 2010).

RSP-de rakendamisel nukleiinhapete transportvektoritena on võimalus kasutada nii kovalentset kui ka mittekovalentset strateegiat (Heitz jt, 2009). Näiteks võib oligonukleotiidid

ühendada RSP-dega disulfiidsildade kaudu, mis dissotseeruvad redutseerivasse keskkonda, sh tsütoplasmasse, jõudes ning lastmolekul vabaneb (Ezzat jt, 2010). Samas on oligonukleotiidid võimelised moodustama RSP-dega ka mittekovalentseid komplekse, seda peptiidide järjestuses olevate positiivsete laengute ja nukleiinhapete negatiivsete laengute kaudu (Heitz jt, 2009).

1.4 RSP-de sisenemismehhanismid

Teoreetiliselt hõlmab RSP-de rakkudesse sisenemine erinevaid etappe (Mäe jt, 2009). Esiteks toimub esmase kontakt loomine RSP-de ja rakupinna vahel ning see määrab ära kasutatava sisenemismehhanismi (Heitz jt, 2009). Järgmises etapis translokeeruvad RSP-d üle plasmamembraani, kuid praeguseks pole täpselt teada, millist sisenemismehhanismi kasutades. Uuringud on näidanud, et üks RSP on võimeline sõltuvalt eksperimenditingimustest kasutama mitut erinevat rakku sisenemise meetodit, mis üldjoontes jaotuvad kahte rühma: endotsütoos ja otsene translokatsioon. Peale selle on teada, et RSP-de sisenemismehhanismi valikut mõjutavad mitmesugused peptiidi ja lastmolekuli omadused. Nendeks omadusteks võivad olla peptiidi pikkus, lastmolekuli suurus, laeng jne (Mueller jt, 2008). Viimane etapp hõlmab RSP-de liikumist erinevate rakusiseste organellideni, oluline on veel, et endotsütoosi teel sisenenud RSP-d väljuvad vesiikulitest. (Mäe jt, 2009)

Endotsütoos on RSP-de peamine rakkudesse sisenemise viis (Duchardt jt, 2007) ning selle toimumise korral moodustub plasmamembraani sissesopistumisel tsütoplasmasse edasi liikuv vesiikul, mille sisemusse jääb RSP ja lastmolekuli kompleks (Doherty ja McMahon, 2009). Endotsütoos on energiast sõltuv protsess, mis jaguneb kaheks: fagotsütoosiks ja pinotsütoosiks. Suuremate osakeste sisenemisel rakkudesse kasutatakse fagotsütoosi ja vedelike ning väiksemate komponentide omastamisel pinotsütoosi (Conner ja Schmid, 2003). Omakorda võivad RSP-d siseneda rakkudesse erinevate pinotsütoosiradade kaudu, milleks on makropinotsütoos (Wadia jt, 2004), klaritiin-sõltuv endotsütoos (Richard jt, 2005) või kaveoliin-sõltuv endotsütoos (Fittipaldi jt, 2003). Peale selle on RSP ja lastmolekuli komplekside sisenemisel võimalik kõikide radade samaaegne rakendamine (Duchardt jt, 2007).

Eelnevalt mainitud endotsütoosiradade kasutamise puhul on oht RSP ja lastmolekuli kinnijäämiseks endotsütootilistesse vesiikulitesse ning see vähendaks transporditavate ainete biosaadavust rakus (Mueller jt, 2008). Seetõttu on oluline mõista peptiidi ja lastmolekulide omaduste mõju sisenemismehhanismi valikus ja parandada RSP väljumist vesiikulitest.

1.5 RSP-de toksilisus

RSP-de toksilisust on uuritud suhteliselt vähe, kuid siiani on RSP-de vahendatud ühendite transport rakkudesse näidanud madalamat toksilisust võrreldes teiste transfektsioonimeetoditega. Siiski võib RSP-de kasutamisel transportvektoritena kaasneda toksilisus, seda näiteks RSP liikumisel üle plasmamembraani või peale peptiidi ja lastmolekuli kompleksi jõudmist raku sisemusse. (Lundberg ja Langel, 2003) Näiteks on kõrgematel RSP-de kontsentratsioonide kasutamisel täheldatud RSP-de toksilist mõju rakkudele, seda tõenäoliselt sisenemisel tekkivate membraanihäirete tõttu, mis viivad tsütoplasma lekkimiseni (Saar jt, 2005). Lisaks segab RSP-de translokeerumine suure tõenäosusega ka plasmamembraanis paiknevate valkude funktsioneerimist ja mõjutab seeläbi rakkude elumust (Lundberg ja Langel, 2003). Seetõttu tuleb uute potentsiaalsete RSP-de väljatöötamise järel veenduda ka nende ohutuses.

On olemas mitmeid meetodeid, mille abil hinnatakse ainete mõju rakkude elujõulisusele, ning heaks indikaatoriks RSP-dega töötlemise järel on plasmamembraani lekkimise tuvastamine. Üheks meetodiks on trüpaansinise lisamine (Melamed jt, 1969). Kuna seda värvainet ei võeta sisse elusatesse, terve plasmamembraaniga rakkudesse, võimaldab see võrrelda RSP-dega töödeldud rakukultuuris olevate surnud rakkude arvu elusate rakkude omaga. Peale selle on RSP-de indutseeritud toksilisust võimalik hinnata ka katioonse florokroomi propiidiumiodiidiga (PI), mis rakku sisenemisel seondub DNA-ga (Smolewski jt, 2002). Sarnaselt trüpaansinisele ei ole PI võimeline läbima intaktset plasmamembraani.

RSP-de tsütotoksilisuse hindamiseks kasutatakse ka *CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay*-d, mis mõõdab tsütotoksilisusega seotud proteolüütilist aktiivsust. Antud testis kasutatakse luminogeenset peptiidisubstraati (AAF-GloTM substraat), et mõõta proteaasi aktiivsust, mida vabastavad ainult intaktse membraani kaotanud rakud. Antud substraat ei läbi tervet plasmamembraani ja kuna elusad rakud seetõttu signaali ei anna, on võimalik leida surnud rakkude arv. Peale AAF-GloTM substraadiga töötlemist ja surnud rakkude arvu mõõtmist lüüsitakse ülejäänud rakud, et leida kogu rakkude arvu. Rakkude elumuse (*viability*) leiab kõikide rakkude arvust surnud rakkude arvu lahutamise teel.

1.6 RSP-de modifitseerimise võimalused

RSP-d on osutunud atraktiivseteks ühendite rakkudesse transportimise meetodiks, kuid nende kohaletoimetamise efektiivsust piirab RSP ja lastmolekuli komplekside kinnijäämine endosomaalsetesse vesiikulitesse. Sellest takistusest ülesaamiseks tuleb RSP-sid keemiliselt

modifitseerida. Üheks strateegiaks on peptiididele rasvhappejääkide lisamine (Mäe jt, 2009). Näiteks on amfipaatsetele RSP-dele stearüülrühma lisamine näidanud peptiidide endosoomidest vabastavat toimet ja viinud transfektsiooni tuntava tõusuni rakkudes, seda eriti stearüülitud TP10-ne puhul (Lehto jt, 2011). Lisaks stearüülrühmale on RSP-dega seotud viirustest eraldatud fusogeenseid peptiide (nt HA2), et kutsuda esile lastmolekulide vabanemist vesiikulitest (El-Sayed jt, 2009). Veel on välja arendatud penetratiini analoog EB1, mis on võimeline endosoomidest kergemini väljuma. Seda tõenäoliselt seetõttu, et peptiid moodustab endosoomide happelises keskkonnas amfipaatse heeliski struktuuri, mis aitab läbida endosoomide membraane (Lundberg jt, 2007).

Endosoomidest vabanemise järel on oluline veel RSP-de vahendusel transporditavate lastmolekulide jõudmine spetsiifiliste sihtmärkrakkudeni. Näiteks vähiravis kasutatavate ühendite transportimisel tuleks rakendada ka vähirakkude spetsiifilisi RSP-sid, sest vastasel juhul manustataks ravimeid nii immortaliseerunud kui ka tervetele rakkudele. (Fonseca jt, 2009) Antud spetsiifilisuse saavutamiseks on RSP-de külge konjugeeritud vähi *homing* domeene ning üheks näiteks on gliooma spetsiifilise vektori gHoPe2 loomine (Eriste jt, 2013).

Sihtmärkrakuni jõudmise järel peab RSP koos lastmolekuliga liikuma rakusiseste organellideni. Suurem osa uurimustest on keskendunud peamiselt RSP-de liikumisele läbi plasmamembraani ning vähem on uuritud peptiidide jõudmist rakusisestesse organellidesse. Kuna enamik RSP-dest lokaliseeruvad tuuma või tsütoplasmasse, võib bioloogilist või meditsiinilist tähtsust lisada RSP-de kasutamisele oskus neid modifitseerida viisil, mis muudab peptiidide sihtmärgiks ka teised rakuorganellid. (Fonseca jt, 2009) Eriti kasulik oleks see juhul, kui rakku transporditav lastmolekul peab funktsioneerimiseks olema konkreetses asukohas. Näiteks võidakse erinevate haiguste ravis kasutada mitokondrite spetsiifilisi ravimeid ning järelikult vajavad need ravimid toimimiseks juurdepääsu sellesse organelli. Nende ravimite kohaletoimetamist on üritatud saavutada sünteetiliste mitokondritesse sisenevate peptiidide (MSP-de) arendamisega. Sarnaselt raku plasmamembraane läbivate RSP-dega, peavad MSP-d olema katioonsed, kuid lisaks sellele ka lipofiilsed, sest mitokondrite membraan on võrreldes raku plasmamembraaniga veel hüdrofoobsem. (Horton jt, 2008)

1.7 Transportaanist NickFectideni

Transportaan on 27 aminohappest koosnev kimäärne peptiid, mille aminoterminaalses osas paikneb kaksteist aminohapet neuropeptiidist galaniin ja karboksüülterminaalses osas neliteist aminohapet vapsiku toksiinist mastoparaan ning neid järjestusi ühendab lüsiin (Pooga

jt, 1998). Transportaani järjestuse osalise kõrvaldamise teel on saadud 21 aminohappest koosnev TP10 (Soomets jt, 2000) ning sellele peptiidile N-terminaalsesse otsa stearüülrühma lisamisel veel efektiivsem kandjavektor stearüül-TP10 ehk PepFect3 (PF3) (Mäe jt, 2009). TP10-ne stearüülimine tõi kaasa tuntava pDNA transfektsiooni tõusu rakkudes, tõenäoliselt tänu RSP ja lastmolekuli kompleksi paranenud endosoomidest vabanemisele (Lehto jt, 2011). Seetõttu on uute RSP-de disanimisel lähtutud ka PF3-st.

PF3-e baasil on arendatud ka NickFectid (NF-id). NF1-s ja NF2-s asendati PF3-e 8.positsioonis olnud isoleutsiin hüdrofoobsema aminohappegga treoniin ja järjestusse lisati ka fosfaatrühm, mis on teatavasti üks rakumembraani komponent. Fosfaatrühma lisamine peptiidahelasse tõstis veelgi selle hüdrofoobsust, suurendas pH sõltuvust ja vähendas laengut. NF1-l on fosforüülgrupp lisatud türosiinile (Tyr3-le) ja NF2-l treoniinile (Thr8-le). Need kaks RSP-d on *in vitro* eksperimentides näidanud võimet efektiivselt transportida splaissingut korrigeerivaid oligonukleotiide, seda lausa neli korda kõrgema efektiivsusega kui LipofectamineTM2000. (Oskolkov jt, 2011) Lisaks splaissingut korrigeerivate oligonukleotiide transportimisele on NF perekonna peptiide edukalt rakendatud siRNA-de ja pDNA-de viimisel erinevatesse rakutüüpidesse (Arukuusk, 2013). Seda arvesse võttes on mitmed NF-id sobilikud kandidaadid ka *in vivo* katseteks.

1.8 Tahke faasi peptiidisüntees

Peptiidide sünteesimiseks võib kasutada nii vedelikus kui ka tahkel kandjal peptiidisünteesi. Tänapäeval kasutatakse enamasti Bruce Merrifieldi välja töötatud tahke faasi peptiidisünteesi meetodit (SPPS) (Merrifield, R. B., 1963), kuna see võimaldab lihtsamalt ja kiiremini sünteesida pikemaid peptiide. Tahke kandja külge sünteesitava peptiidi eeliseks on võimalus kasutada ülehulgas reagente, viia kõik sünteesi etapid läbi ühes reaktsiooninõus ning pesta või filtreerida ülearune kogus reagente ja kõrvalprodukte välja. Selleks peavad protsessis kasutatavad tahked kandjad olema lahustumatud sünteesimisel lisatavatele lahustitele. Sobilikeks kandjateks on ristseotud stüreen-divenüülbenseeni kopolümeerid, millele kinnituvad funktsionaalrühmadega vahelülid ehk *linkerid* (tavaliselt 0,5-0,8 mmol/g kandja kohta). Vahelülid on vajalikud esimese aminohappe seondumiseks tahkele kandjale. Pikemate kui 25 aminohapet või keerulisema struktuuriga peptiidide puhul kasutatakse väiksemat vahelülide arvu kandja kohta (0,1-0,2 mmol/g). Reagentide juurdepääsu terakeste maatriksis olevate vahelülideni võimaldavad diklorometaan (DCM) ja N, N-dimetüülformamiid (DMF) lahused. DCM-i lisatakse polüstereenipõhise kandja pundumiseks ja DMF-i reagentide lahustuvuse parandamiseks. (Amblard jt, 2005)

Peptiidahela sünteesimisel C-terminusest N-terminuse suunas kasutatakse tahke kandjana 4-metüülbenshüdrüülamiini (MBHA), mille puhul on vahelüli funktsionaalseks rühmaks NH_2 . Peptiidisüntees koosneb korduvatest protsessidest. Esimeses etapis seotakse peptiidjärjestuse kõige C-terminaalsem aminohape vahelüli kaudu tahke kandjaga. Esimese aminohappe seostumisele järgneb selle aminohappe N^α kaitserühma eemaldamine. Seejärel aktiveeritakse järgmisena liidetava aminohappe C^α karboksüülrühm. Oluline on, et aktiveerimisel on seotava aminohappe N^α kaitserühm ning funktsionaalsed kõrvalrühmad kaitstud. Aktiveerimiseks kasutatakse peamiselt fosfoonium ja uroonium reagente, näiteks sobivad DMF-s lahustatud N-[1H-Bensotriasool-1-üül](dimetüülamino)metüleen]-N-metüülmetaanamiinium heksaflorofosfaat (HBTU) ja 1-hüdroksübensotriasool (HOBt). Samuti lisatakse tertsiaalset amiini, näiteks N, N-diisopropüületüülamiini (DIEA-d), mis aitab kaasa aktivaatoriga reageeriva aminohappe karboksülaadi tekkele. Selle tulemusena antud aminohapped liituvad peptiidsideme tekkides. Antud protseduuri korratakse kuni soovitud aminohappejärjestuse saamiseni ning pärast viimase aminohappe ajutise kaitserühma eemaldamist toimub püsivate kaitserühmade eemaldamine ja peptiidi lõikamine tahke kandja küljest. (Amblard jt, 2005)

SPPS jaguneb aminohapete ajutiste kaitserühmade kasutamise alusel peamiselt kahte rühma, milleks on Fmoc/tBu ja Boc/Bzl sünteesistrateegiad. Boc/Bzl strateegia puhul on aminohappe ajutine N^α kaitserühm tert-Butüüloksükarbonüül (t-Boc) happelabiilne ning seega eemaldatav trifluoroatseethappega (TFA-ga). Peptiidi lõikamiseks tahkelt kandjalt ja kõrvalahelate eemaldamiseks kasutatakse samuti hapet, milleks võib olla veevaba vesinikfluoriid (HF). Kuna Boc/Bzl keemias t-Boc-i eemaldamiseks kasutatav HF on ülimalt toksiline ja võib kõrge happelisusega keskkonna loomise tõttu põhjustada molekulide struktuuride lagunemist, eelistatakse peptiidisünteesil kasutada Fmoc/tBu strateegiat.

Fmoc keemias on aminohappe ajutiseks N^α kaitserühmaks aluslabiilne 9-fluoroenüülmetüüloksükarbonüül (Fmoc) rühm ja kõrvalrühmad, linker on kaitstud happelabiilsete rühmadega. Ajutise Fmoc kaitserühma eemaldamiseks luuakse aluseline keskkond 20% piperidiini lahuse lisamisega. (Amblard jt, 2005) Happelabiilsete kaitserühmade eemaldamiseks võib kasutada trifluoroatseethapet (TFA-d), mis sisaldab tioole või silaane, näiteks triisopropüülsilaani (TIS-i). Tioolide või silaanide lisamine neutraliseerib eemaldunud kaitserühmad ning ei lase neil tagasi kinnituda.

Eelmainitud aminohappe liitumisreaktsiooni ja ajutiste kaitserühmade eemaldamisreaktsiooni efektiivsust on võimalik kontrollida ninhüdrin testiga (Kaiser test). Ninhüdrin test põhineb ninhüdrini võimel siduda endaga vabasid aminorühmi ja moodustada seejärel sinine ühend. Vabade aminorühmade puudumisel jääb lahus kollaseks. (Amblard jt,

2005) Näiteks peaks Fmoc keemias pärast uue aminohappe sidumist aminorühmad olema kaitstud Fmoc rühmadega ning ninhüdriin testi lahus olema kollane. Kontrollimine näitab, kas aminohapped on jõudnud liituda igasse peptiidahelasse. Mõnikord on vajalik korrata aminohappe sidumise reaktsiooni või blokeerida osade peptiidahelate edasine süntees, et ei tekiks osaliselt puuduvate aminohapetega peptiidijärjestusi.

1.8.1 Sünteesitud peptiidide puhastamine

Sünteesitud peptiidid tuleb tahkelt kandjalt eemaldamise järel puhastada, kuna sünteesi käigus tekib mingil määral osaliselt puuduvate aminohapetega järjestusi ja väike kogus kõrvalprodukte (Doonan, 2002). Tavaliselt kasutatakse peptiidide puhastamiseks pöördfaas vedelikkromatograafia (RP-HPLC) meetodit. RP-HPLC põhineb molekulide üksteisest lahutamisele hüdrofoobsuse alusel. Puhastamiseks kasutatakse roostevabast terasest kolonne, mille statsionaarse faasi pind (silikageel) on muudetud hüdrofoobseks ja tugevamini vähempolaarseid aineid seondavaks. Selleks on silikageeli hüdroksüülrühmad asendatud mittepolaarsete rühmadega, milleks võivad olla oktadetsüül (C18), n-oktüül (C8), n-butüül (C4) jne. (Aguilar, 2004) Peptiidi elueeritakse vee ja orgaanilise solvendi, tihti atseetonitriili (ACN), lahuses läbi kolonni (Doonan, 2002). Elueerimisel tõuseb ACN-i kontsentratsioon ning sellega muutub mobiilne faas vähem polaarseteks ja soodustab hüdrofoobsemate ühendite väljumist. Sellepärast liiguvad polaarsemad, hüdrofiilsed ained, nt hüdrofiilsematest aminohapetest koosnevad peptiidid, pöördfaaskolonnis kiiremini vähempolaarsest ja hüdrofoobsest ainest.

1.8.2 Sünteesitud peptiidide analüüsimine MALDI-TOF massispektromeetriga

MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*) massispektromeetria on kiire ja kasutusmugav vahend määramaks täpselt varieeruva suurusega ühendite molekulmasse. Massispektromeetri kasutamiseks segatakse väike kogus uuritavat ühendit maatriksiga ja pipeteeritakse selleks ettenähtud plaadile. Tavaliselt on maatriksiks α -tsüaano-4-hüdroksükaneel hape (CHCA). Maatriksi ülesandeks on eraldada analüüdi molekulid üksteisest ja kaitsta neid laserkiirte poolt lagundatud saamise eest. (Pan jt, 2007). Pärast proovi kuivamist asetatakse plaat massispektromeetrisse ja laserkiire toimel uuritav aine ioniseeritakse. Ioniseeritud molekulid kiirendatakse elektriväljas,

kust nad lenduvad edasi detektorini lennutoru lõpus. Detektorini jõudmise aeg sõltub iooni molekulmassist ja laengust (m/z), suurema molekulmassiga osakesed lenduvad aeglasemalt kui väiksema molekulmassiga ning iga detekteeritud iooni järel registreeritakse spektris piik. (Doonan, 2002) Sünteesitava peptiidi molekulmassi eelnev väljaarvutamine võimaldab määrata, kas antud produkti leidub analüüsitavas aines.

2 Eksperimentaalne osa

2.1 Töö eesmärgid

Eksperimentaalse töö eesmärgid:

- Sünteesida Fmoc/tBu tahke faasi peptiidisünteesi strateegiat kasutades järgmised rakku sisenevad peptiidid:
L1 (Stearüül-AGELLGKTNLKALAALAKKIL-NH₂);
L1 (Stearüül-AGYLLGKENLKALAALAKKIL-NH₂).
- Puhastada sünteesitud peptiidid pöördfaas vedelikkromatograafiaga (RP-HPLC) ja teha kindlaks õigete produktide olemasolu MALDI-TOF massispektromeetria abil.
- Hinnata sünteesitud peptiidide tõhusust plasmiidide transportvektoritena kasutades mittekovalentset ko-inkubatsiooni strateegiat. Selleks moodustatakse sünteesitud peptiidide kompleksid pGL3 plasmiidiga. Antud kompleksidega transfecteeritakse HeLa (inimese emakakaelavähi rakud) ja MEF (hiire embrüonaalsed fibroblastid) rakke. RSP-de pDNA transportimise efektiivsust võrreldakse LipofectamineTM2000-e, NF1-e ja NF2-e võimega.
- Määrata peptiid/pDNA komplekside mõju rakkude elumusele *CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay* abil.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Peptiidide süntees

NF1 ja NF2 on stearüül-TP10 modifitseerimisel saadud 21 aminohappe pikkused järjestused (Oskolkov jt, 2011), millest on disainitud antud töö jaoks RSP-d L1 ja L2.

Peptiidide (L1 ja L2) sünteesimisel kasutati Fmoc/tBu tahke faasi peptidisünteesi meetodit. Peptiidid sünteesiti astmeliselt kasutades 0,1 mmol skaalat ning sünteesid viidi läbi käsitsi. Tahke kandjana kasutati 240 mg Rink-amiid MBHA vaiku, millele olid kinnitunud funktsionaalrühmadega vahelülid 0,41 mmol/g kandja kohta. Peptiidahela süntees toimus C-terminusest N-terminuse suunas. Sünteesimiseks võeti kõiki aminohappeid 5-kordses ülehulgas funktsionaalrühmadega vahelülide kohta. Ajutised aluslabiilsed Fmoc kaitserühmad eemaldati 20%-lise piperidiini lahusega DMF-s ja liidetavad aminohapped aktiveeriti 4-kordses ülehulgas 0,5 M HOBt ja 0,5 M HBTU ning 8-kordses ülehulgas 5,8 M DIEA lisamisel. Sünteesimisel kontrolliti iga Fmoc grupi eemaldamise ja uue aminohappe liitumisreaktsiooni efektiivsust ninhüdriin testiga ning vajadusel korraldati aminohappe sidumise reaktsiooni või blokeeriti reageerimata aminorühmasid sisaldavate peptiidahelate edasine süntees. Soovitava peptiidjärjestuse valmides lisati viimasena N-terminaalsesse otsa steariinhape. Seejärel toimus peptiidi lõikamine tahkelt kandjalt lahusega, mis sisaldas 95% TFA-d, 2,5% vett ja 2,5% TIS lahust. Lõikamisreaktsiooni järel eraldati peptiid tahkest kandjast ja sadestati vee lisamisel. Peptiidi vesilahusele lisati jääkülma eetrit, et eemaldada eetris lahustuvad orgaanilised ained, ja lahus külmutati. Eeter eemaldati ja vesifaasi jäänud külmunud peptiid kuivatati üleöö lüofilisaatoris.

Sünteesitud aine lüofiliseerimise järel toimus selle puhastamine kõrvalproduktidest RP-HPLC abil. Peptiidid lahustati lahuses ja lasti kõrge rõhu all liikuda läbi pöördfaasi HPLC C4 kolonni. Gradiendiks oli 20-80% ACN/H₂O lahus, mis sisaldas 0,1% TFA-d.

Sünteesitud produktide molekulmasside määramiseks kasutati MALDI-TOF massispektromeetriat. Selleks segati väike kogus uuritavat ühendit ettenähtud plaadil maatriksiga α -tsüaano-4-hüdroksükaneelhape (CHCA). Proovi kuivamise järel asetati plaat massispektromeetrisse, kus maatriks ja uuritav aine ergastati laserkiirte abil. Ioniseeritud molekule kiirendati elektriväljas, kust nad lendusid sõltuvalt iooni molekulmassist ja laengust detektorini ja iga detekteeritud iooni järel registreeriti spektris piik.

2.2.2 Kasutatud rakuliinid

Antud töös kasutati HeLa (inimese emakakaelavähi rakud) ja MEF (hiire embrüonaalsed fibroblastid) rakke, mida kasvatati 37°C juures 5% CO₂ keskkonnaga inkubaatoris. HeLa rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) söötmes, millesse oli lisatud 10% veise loote seerumit (FBS-i), 0,1 mM asendatavaid aminohappeid, 1,0 mM naatriumpüruvaati, 100 IU/ml penitsilliini ja 100 µg/ml streptomütsiini. MEF rakke kasvatati samade koostisosadega söötmes, kuid asendatavad aminohapped olid välja jäetud. Rakke lahjendati iga 2-3 päeva tagant 2:10-le söötmes.

2.2.3 Peptiid/plasmiid komplekside moodustamine

Eksperimentides kasutati lutsiferaasi ensüümi kodeerivat pGL3 plasmiid. Tänu plasmiidi fosfaatselgroo negatiivsetele laengutele ja peptiidijärjestustes paiknevatele positiivsetele laengutele moodustuvad RSP ja plasmiidi kokkusegamisel elektrostaatiliste interaktsioonide abil kompleksid.

Komplekside moodustamiseks segati uuritavat peptiidi vees pGL3 plasmiidiga erinevate laengusuhete juures (CR1, CR2, CR3, CR4). Plasmiidi ja peptiidi komplekside ruumala pidi moodustama 1:10 rakkudele kantavast lõppruumalast (500 µl) ehk 50 µl. Komplekse inkubeeriti 1 h toatemperatuuril ning seejärel kanti üle rakkudele, kuhu oli eelnevalt pipeteeritud 450 µl täissöödet (söödet, mis sisaldas veise loote seerumit, asendatavaid aminohappeid, naatriumpüruvaati ja antibiootikume) või seerumivaba söödet. LipofectamineTM2000 kompleksid plasmiidiga valmistati tootja protokollil alusel (Promega, USA).

2.2.4 Komplekside transfektsioon rakukultuuri

Katse läbiviimiseks külvati 24 tundi enne erinevate peptiid/plasmiid komplekside pealepanekut 24-kaevulistele plaatidele HeLa või MEF rakke. Täpsemalt 50 000 rakku 1 ml-s DMEM täissöötmes ühe kaevu kohta. Rakke inkubeeriti 37°C juures 5% CO₂ keskkonnas.

Ettenähtud aja möödudes asendati rakkudel olnud vana sööde uuega, selleks pipeteeriti plaadil olevastesse söötimest tühjendatud kannudesse 450 µl seerumivaba või täissöödet, LipofectamineTM2000-ga töödeldavatesse rakkudesse pandi 400 µl söödet. Seejärel kanti 4 tunniks rakkudele peale 50 µl peptiid/plasmiid komplekse erinevates laengusuhetes (CR1, CR2, CR3, CR4). LipofectamineTM2000-ga töödeldud rakke kasutati positiivse kontrollina ning neile lisati komplekse peale 100 µl. Negatiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke ja

neile rakkudele komplekse ei lisatud. 4 tunni möödudes lisati kõikidesse kaevudesse 1000 µl täissöödet ning inkubeeriti veel 20 tundi. 20 tunni möödumisel eemaldati rakkudelt sööde, neid pesti PBS puhvriga ning lüüsi 100 µl-is HKR puhvril, mis sisaldas 0,1% Triton X-100-t. Lüüsimine toimus 30 minutit +4°C juures.

Rakkudesse RSP-de vahendusel transporditud pGL3 plasmiidilt toimub lutsiferaasi ensüümi süntees ning antud ensüüm on lutsiferiini oksüdeeriva omadusega. Lutsiferiini olemasolul keskkonnas algab oksüdeerimisreaktsioon, mille käigus eraldub valgusenergia, mida on võimalik mõõta luminomeetriga. Antud juhul rakendati lutsiferaasi aktiivsuse mõõtmiseks *GLOMAXTM 96 microplate* luminomeetrit (Promega, Rootsi). Selleks pipeteeriti 96-kaevulisele plaadile 20 µl rakulüsaati. Rakulüsaadile lisati 80 µl *Luciferase Assay Reagent*-i ja koheselt mõõdeti luminesentsi. Saadud tulemused normaliseeriti vastavalt proovide valgu kontsentratsioonidele (Lowry, BioRad DC), et vähendada rakkude arvukusest tulenevaid vigu, ning kahe katse keskmised tulemused esitatakse ühikutes RLU/mg.

2.2.5 Tsütotoksilisus

96-kaevulisele plaadi igasse kaevu külvati 24 tundi enne eksperimendi läbiviimist 10 000 MEF või HeLa rakku 100 µl-is DMEM täissöötmes.

Järgmisel päeval valmistati steriilses keskkonnas erinevatel laengusuhetel (CR2, CR3, CR5) peptiidide (NF1, NF2, L1, L2) ja LipofectamineTM2000 kompleksid pGL3 plasmiidiga. Komplekse moodustati arvestusega, et igasse kaevu läheb 10 µl. Komplekse inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril ja ettenähtud aja möödudes lisati neile seerumit sisaldavat täissöödet. Eelmisel päeval külvatud rakkudelt eemaldati sööde ja pandi peale 100 µl komplekse täissöötmes. Transfekteerimiseks jäeti rakud kompleksidega 37 °C juurde 4 tunniks. Siis lisati igasse kaevu 100 µl täissöödet ja inkubeeriti veel 20 tundi.

20 tunni möödudes hinnati *CytoTox-GloTM Cytotoxicity Assay* abil peptiid/plasmiid komplekside mõju rakkude elumusele, seda toksilisusega seostatud proteaasi aktiivsuse kaudu. Esmalt mõõdeti surnud rakkude proteaasset aktiivsust AAF-GloTM substraadi abil, mida lisati igasse kaevu 50 µl. 15 minutit pärast substraadi pealepanekut mõõdeti luminomeetriga luminesentsi ja saadi surnud rakkude arvud. Seejärel lüüsi ka elusad rakud 50 µl lüüsilahuse (*Lysis Reagent*) lisamisega igasse kaevu. Lüüsilahus oli kindlas vahekorras *Digitonin* ja *Assay Buffer*. 15 minuti möödudes mõõdeti uuesti luminesentsi ning leiti totaalne rakkude arv. Totaalne rakkude arv võimaldab omakorda määrata elusate rakkude arvukuse (*viability*) surnud rakkude arvu kaudu. Tulemustes esitatud andmed on kahe katse keskmised ning 100% vastab töötlemata rakkude elumusele.

2.3 Tulemused ja arutelu

Erinevate haigusseisundite ravis omavad potentsiaali terapeutilised nukleiinhapped (nt pDNA-d, SKO-d, siRNA-d jne), kuid nende kasutamist limiteerivad ebastabiilsus seerumi juuresolekul ja tagasihoidlik rakku sisenemise võime. Viimane neist on tingitud ühendite suurest molekulmassist, negatiivsest laengust ja hüdrofiilsest olemusest. Seetõttu on esmaseks väljakutseks nukleiinhapete kasutamisel arendada transportvektoreid, mis viiksid nad tuuma ja takistaksid nende lagundamist rakuensüümide poolt. (Al-Dosari ja Gao, 2009)

Erinevatest transpordistrateegiatest on atraktiivseteks nukleiinhapetele kandjavektoriteks osutunud RSP-d, mis on madala tsütotoksilisusega (Järver ja Langel, 2004) ja võimega säilitada transportimisel ühendite bioloogilise aktiivsuse (Fonseca jt, 2009). Samas on RSP-de rakendamisel pDNA transporteritena jäänud transfektsiooniefektiivsus suhteliselt madalaks. Tõenäoliselt kasutavad RSP ja pDNA kompleksid sisenemisel erinevaid endotsütoosiradu, jäävad endosoomidesse lõksu ning ei jõua rakutuumas.

Transfektsiooniefektiivsuse tõstmise eesmärgil töötatakse pidevalt välja uusi või modifitseeritakse juba olemasolevaid RSP-sid. Näiteks on saadud TP10-st stearyülimisel veel efektiivsem pDNA transporter PF3, sest stearyülimine parandas kompleksi vabanemist endosoomidest (Lehto jt, 2011). PF3 baasil on arendatud ka NickFect perekonna peptiide, mis on samuti võimelised tõhusalt transportima pDNA-d erinevatesse rakuliinidesse (Arukuusk jt, 2013). Lisaks sellele on NF-te kasutatud SKO-de (Oskolkov jt, 2011) ja siRNA-de transporteritena (Arukuusk jt, 2013).

Antud töös disainiti ja sünteesiti uued NickFect1 (NF1) ja NickFect2 (NF2) (Oskolkov jt, 2011) analoogid L1 ja L2, et uurida nende võimet transportida rakkudesse plasmiidset DNA-d (pDNA-d). Reportergeeni sisaldavate pDNA-de transportimine on üks kergemini rakendatavaid meetodeid uute RSP-de transfektsiooniefektiivsuse jälgimiseks (*plasmid display*) (Gao jt, 2010). Antud töös kasutatakse peptiidide efektiivsuse uurimiseks lutsiferaasi ensüümi kodeerivat pGL3 plasmidi.

Töös kasutatud peptiidid NF1, NF2, L1 ja L2 (tabel 1) erinesid üksteisest vähesel määral. Kui NF1 türosiinile (Tyr3, Y) ja NF2 treoniinile (Thr8, T) on lisatud fosfaatrühm, siis analoogidel on vastavalt türosiin või treoniin asendatud glutamiinhappega (Glu, E). Nii fosfaatrühm kui ka glutamiinhape omavad füsioloogilisel pH-l negatiivset laengut. Antud modifikatsioon tehti eesmärgiga hinnata, kas NickFectid hea penetreerimisvõime on seotud pigem järjestuses fosfaatrühma, mis on üks rakumembraani komponent, olemasoluga või hoopis täiendava negatiivse laengu lisamisega järjestusse.

Tabel 1. Eksperimendis kasutatud peptiidide järjestused ja molekulmassid

Peptiid	Järjestus	Molekulmass
NF1	Steariül-AGY(PO₃)LLGKTNLKALAALAKKIL-NH ₂	2514
NF2	Steariül-AGYLLGKT(PO₃)NLKALAALAKKIL-NH ₂	2514
L1	Steariül-AGELLGKTNLKALAALAKKIL-NH ₂	2400
L2	Steariül-AGYLLGKENLKALAALAKKIL-NH ₂	2462

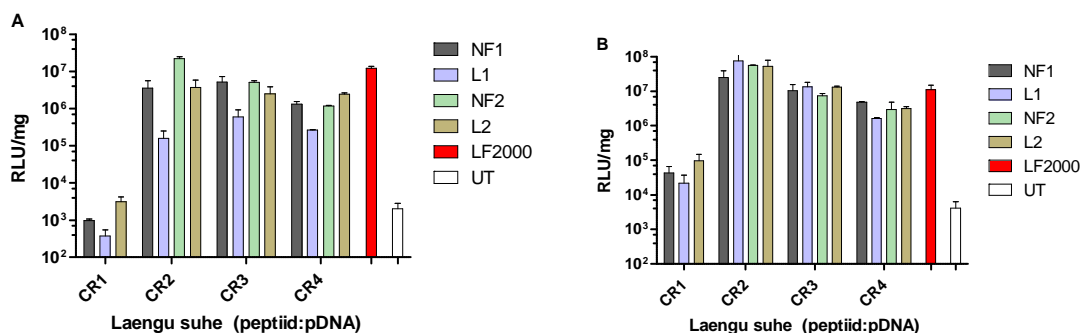
Peptiidid L1 ja L2 sünteesiti käsitsi Fmoc/tBu tahke faasi peptiidsünteesi strateegial. Soovitava järjestuse valmides lisati viimasena N-terminaalsesse otsa steariülrühm. Seejärel lõigati peptiidid tahkelt kandjalt 95% TFA, 2,5% vee ja 2,5% TIS lahusega, ekstraheeriti jääkülmas eetris, külmutati ja kuivatati üleöö lüofilisaatoris. Saadudprodukte analüüsiti MALDI-TOF massispektromeetri abil. Järgmiseks lahustati kumbki lüofiliseeritud produkt 2 ml-s 20% ACN/H₂O lahuses, mis sisaldas 0,1% TFA-d, ja puhastati RP-HPLC meetodil kõrvalproduktidest. Seejärel määrati produktide puhtus samuti MALDI-TOF massispektromeerit kasutades.

Puhaste peptiidide saamisel sooritati transfektsioonikatsed. Selleks transfekeeriti HeLa (joonis 2) ja MEF (joonis 3) rakke erinevate laengusuhetega (CR1, CR2, CR3, CR4) peptiid/plasmiid kompleksidega, mis olid moodustatud mittekovalentsel ko-inkubatsiooni strateegial. Katseid viidi läbi nii seerumit sisaldavas söötmes kui ka seerumivabas söötmes. Negatiivse kontrollina kasutati töötlemata rakke ja positiivse kontrollina LipofectamineTM2000-ga töödeldud rakke. LipofectamineTM2000 on kõrge transfektsiooniefektiivsusega lipiidne kandja, aga mõjub rakkudele suhteliselt toksiliselt.

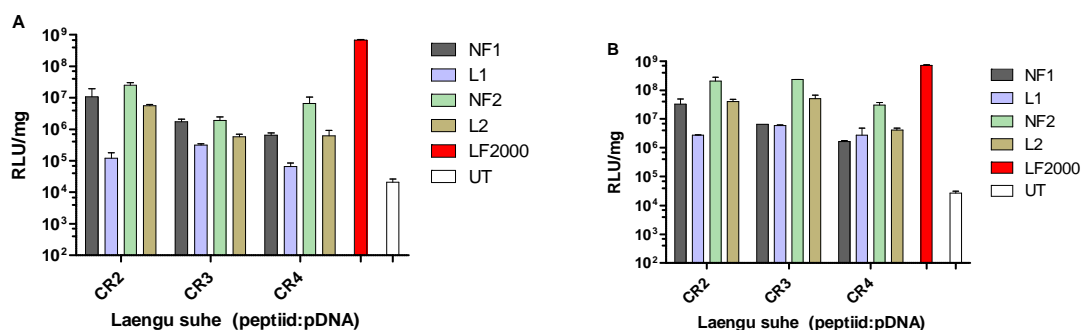
Katsete tulemuste põhjal selgus, et kõik neli peptiidi olid efektiivsed pDNA transportijad. L1 ja L2 näitasid ainult vähesel määral madalamat transfektsiooniefektiivsust kui NF1 ja NF2. Kõige madalamat pGL3 plasmiidi transfektsiooniefektiivsust kasutatud rakuliinides omas L1. L2 võime transportida rakkudesse plasmiidi oli võrdväärne NF1 efektiivsusega.

RSP-de efektiivsus sõltus kasutatavast rakuliinist ja sellest, kas transfektsiooni viidi läbi seerumivabas või seerumit sisaldavas söötmes. Kuna seerum sisaldab proteaase, mis lagundavad peptiid/plasmiid komplekse, siis seerumit sisaldavas keskkonnas olid peptiidide transfektsiooniefektiivsused madalamad kui seerumivabas söötmes. Seerumivabas söötmes HeLa rakkude transfekeerimisel omasid kõik RSP-d LF2000-ga sarnast efektiivsust ning CR2 ja CR3 puhul isegi suuremat. Seerumiga söötmes olid RSP-de plasmiidide transportimise efektiivsused natuke madalamad kui LF2000-nde oma. MEF rakkudes, mis on ka raskemini

transfekteeritavad, jäid RSP-de transfektsiooniefektiivsused nii seerumiga söötmes kui ka seerumivabas söötmes LF2000-st madalamaks.



Joonis 2. pGL3 plasmidi transport HeLa rakkudesse. Tulemused RLU-des (*relative luminescence unit*) on normaliseeritud vastavalt proovide valgusisaldusele. A) seerumit sisaldavas söötmes läbiviidud transfektsioon, B) seerumivabas söötmes läbiviidud transfektsioon.

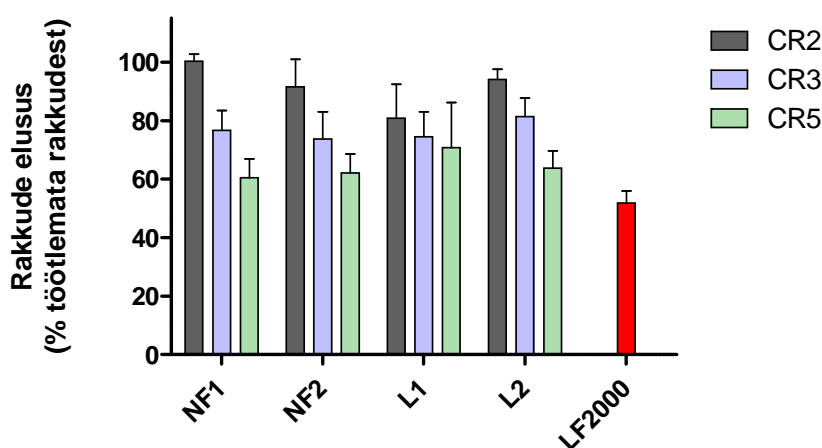


Joonis 3. pGL3 plasmidi transport MEF rakkudesse. Tulemused RLU-des (*relative luminescence unit*) on normaliseeritud vastavalt proovide valgusisaldusele. A) seerumit sisaldavas söötmes läbiviidud transfektsioon, B) seerumivabas söötmes läbiviidud transfektsioon.

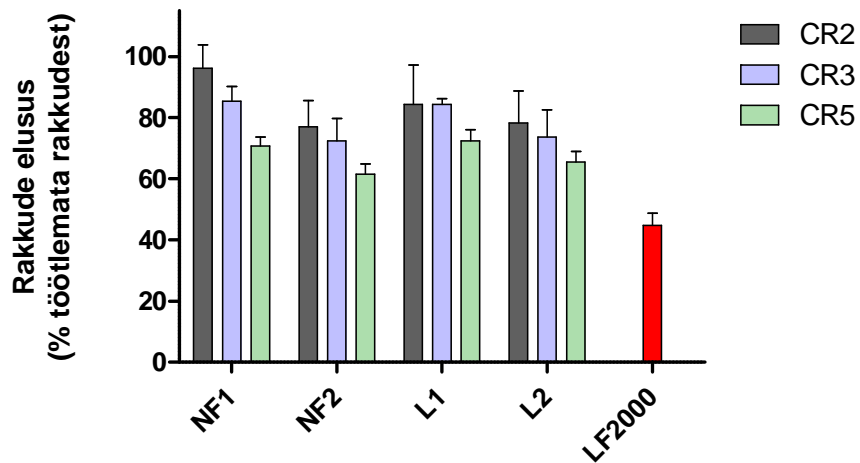
RSP-de kasutamisel kandjavektoritena on olulise tähtsusega ka toksilise efekti puudumine või esinemine väga madalal tasemel. Toksilisus võib RSP-de kasutamisel olla seotud näiteks peptiidi rakku tundimisel tekkivate plasmamembraani häiretega (Lundberg ja Langel, 2003), seetõttu on oluline uurida RSP-de toksilist mõju. Antud uuringus hinnati sünteesitud peptiidide ja pGL3 komplekside mõju HeLa ja MEF rakkudele rakkude elumusele kasutades *CytoTox-GloTM* Cytotoxicity Assay-d.

Varasemalt on uuritud NickFectide seast NF51, NF53 ja NF61 pDNA komplekside (Arukuusk jt, 2013) ja NF1 ja NF2 SKO-de komplekside (Oskolkov jt, 2011) toksilisust erinevatele rakkuliinidele. Nende tulemuste järgi on NickFect perekonna peptiidid vähetoksilised kandjavektorid. Antud eksperimentaalse töö käigus läbiviidud katsete tulemustest avaldus samuti, et RTP/plasmiid kompleksid on suhteliselt vähetoksilised nii HeLa (joonis 4) kui ka MEF (joonis 5) rakkudele.

Kõrgematel RSP-de kontsentratsioonidel on täheldatud RSP-de toksilise mõju kasvu rakkudele, sest tõenäoliselt põhjustavad üle plasmamembraani penetreeruvad peptiidid häireid, mis viivad tsütoplasma lekkimiseni (Saar jt, 2005). Ka antud katses suurenes kõikide RSP-de toksilisus RSP kontsentratsiooni tõustes, kuid jäid ka CR5 juures madalamaks LF2000-nde omast.



Joonis 4. Peptiid/pGL3 komplekside tsütotoksilisus HeLa rakkudes. HeLa rakkude elumust mõõdeti *CytoTox-GloTM* Cytotoxicity Assay-d kasutades 24 tundi peale erinevatel laengusuhetel valmistatud pGL3/peptiid komplekside pealekandmist ja tulemused normaliseeriti töötlemata rakkude elumuse vastu (100%).



Joonis 5. Peptiid/pGL3 komplekside tsütotoksilisus MEF rakkudes. MEF rakkude elumust mõõdeti *CytoTox-GloTMCytotoxicity Assay-d* kasutades 24 tundi peale erinevatel laengusuhetel valmistatud pGL3/peptiid komplekside pealekandmist ja tulemused normaliseeriti töötlemata rakkude elumuse vastu (100%).

Kokkuvõte

Rakku sisenevad peptiidid (RSP-d) on tulevikuperspektiivi omavad kandjavektorid biomolekulidele, mida kasutatakse pärilike ja elu jooksul omandatud haiguste ravis, seetõttu on oluline mõista RSP-de mõju rakkudele ja muuta neid veel efektiivsemateks.

Antud bakalaureusetöö kirjanduse osas anti lühike ülevaade RSP-dest ja nende olulisusest erinevate makromolekulide kandjatena. Lisaks kirjeldati RSP-de sisenemismehhanisme ning sellega kaasnevast võimalikust toksilisusest ja sünteesimisest SPSS meetodil. Peale selle toodi ülevaade modifikatsioonidest, mis on tehtud Transportaanist NickFectide perekonda kuuluvate peptiidide väljatöötamisel. Eksperimentaalses osas sünteesiti NickFect perekonna peptiidide NF1 ja NF2 analoogid L1 ja L2, et uurida nende võimet transfekeerida plasmiidset DNA-d rakkudesse. Muudatused analoogides tehti eesmärgiga hinnata, kas NickFectide võime efektiivselt translokeeruda üle plasmamembraani on seotud järjestuses fosfaatrühma olemasoluga, mis on ka üks rakumembraani komponent ja omab füsioloogilisel pH-l negatiivset laengut, või täiendava negatiivse laengu lisamisega järjestusse glutamiinhappe näol.

Katsetulemuste põhjal on rakku sisenevad peptiidid NF1 ja NF2 vähesel määral parema pDNA transpordivõimega kui nende analoogid L1 ja L2. Samas on oluline märkida, et uued peptiidid L1 ja L2 olid samuti arvestatava transfektsiooniefektiivsusega transportvektorid. Järelikult säilis NickFectidele omane kõrge transfektsiooniefektiivsus ka L1-s ja L2-s fosfaatrühma asendamisel glutamiinhappegaga. Seega leidis töös kinnitust, et antud peptiidide puhul on just negatiivne laeng oluline kõrge transfektsiooniefektiivsuse saavutamiseks ning tõenäoliselt mõjutab fosfaatrühm negatiivse laengu kaudu NF1 ja NF2 efektiivsust.

L1-st ja L2-st osutus tõhusamaks pDNA kandjavektoriks L2, mille pDNA transfektsiooniefektiivsus oli peaaegu sama kõrge kui NF1-l ja NF2-l. Samas oli ka L1 hea transfektsiooniefektiivsusega. Lisaks on L1 ja L2 puhul tegu ka vähetoksiliste kandjavektoritega, mida on võrreldes NF1 ja NF2-ga lihtsam sünteesida. Seetõttu omavad nii L1 kui ka L2 perspektiivi ka edasiseks uurimiseks.

Lisaks senistele katsetele võiks uurida ka uute peptiidide L1-e ja L2-e sisenemismehhanisme ja kasutada neid ka teiste terapeutiliste ühendite (nt SKO, siRNA jne) transporteritena.

Cell-penetrating peptides L1 and L2 for plasmid delivery

Loora Laan

Summary

Cell- penetrating peptides (CPPs) are usually less than 30 amino acids long sequences that are capable of penetrating through cell membranes and delivering different macromolecules, for example pDNA, into cells. Moreover, using CPPs as delivery vectors is considered to be a safe method.

NickFect1 (NF1) and NickFect2 (NF2) are stearylated TP10 analogues that differ from their ancestor for having phosphoryl group added on their sequence. This change has shown quite good results in improving NickFects capability to translocate across the plasma membrane. So, based on NickFects it is possible to create new CPPs that could lead to even better delivery properties.

In this study, two new NickFects analogues were designed to test their ability to transfect cells with pDNA. In new peptides, that are called L1 and L2, phosphoryl group was replaced with glutamic acid. This minor modification in peptide sequences were made to find out if introduction of phosphoryl group to peptides is connected with good ability to move inside the cells or it is caused by the extra negative charge.

Transfection experiments revealed that NF1 and NF2 possess only slightly better ability to transport pDNA into different cell lines compared to L1 and L2. Consequently, additional negative charge in stearyl-TP10 is important to achieve high transfection efficiency.

Kasutatud kirjanduse loetelu

- Aguilar, M-I. (2004). Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography, p 9-22. *In* Aguilar M-I (ed), HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols- Methods in Molecular Biology, vol. 251. Humana Press Inc. Totowa, New Yersey.
- Al-Dosari, M.S., Gao, X. (2009). Nonviral Gene Delivery: Principle, Limitations, and Recent Progress. *The AAPS Journal*. 11(4): 671- 681.
- Allinquant, B., Hantraye, P., Mailleux, P., Moya, K., Bouillot, C., Prochiantz, A. (1995). Downregulation of amyloid precursor protein inhibits neurite outgrowth in vitro. *J Cell Biol*. 128: 919-927.
- Amblard, M., Fehrentz, J-A., Martinez, J., Subra, G. (2005). Fundamentals of Modern Peptide Synthesis, p 3- 24. *In* J. Howl (ed), Peptide Synthesis and Applications- Methods in Molecular Biology, vol 298. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.
- Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov, N., Copolocivi, D.M., Margus, H., Padari, K., Möll, K., Maslovskaja, J., Tegova, R., Kivi, G., Tover, A., Pooga, M., Ustav, M., Langel, Ü. (2013). New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta*. 1828: 1356-1373.
- Conner, S.D., Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*. 422: 37-44
- Derossi, D., Joliot, A.H., Chassaing, G., Prochiantz, A. (1994). The Third Helix of the Antennapedia Homeodomain Translocates through Biological Membranes. *J Biol Chem*. 269(14): 10444-10450.
- Doherty, G.J., McMahon, H.T. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem*. 78: 857-902.
- Doonan, S. (2002). Chemical Synthesis of Peptides, p 20- 43. *In* Doonan, S., ja Abel, E.W (ed.), Peptides and Proteins- Tutorial Chemistry Texts, vol 15. Polester Wheatons Ltd, Exeter.

- Doonan, S. (2002). Determination of the Covalent Structures of Peptides and Proteins, p 74-107. *In* Doonan, S., ja Abel, E.W (ed.), Peptides and Proteins- Tutorial Chemistry Texts, vol 15. Polester Wheatons Ltd, Exeter.
- Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., Brock, R. (2007). A Comprehensive Model for the Cellular Uptake of Cationic Cell-penetrating Peptides. *Traffic*. 8: 848-866.
- El-Sayed, A., Masuda, T., Khalil, I., Akita, H., Harashima, H. (2009). Enhanced gene expression by a novel stearylated INF7 peptide derivative through fusion independent endosomal escape. *J Control Release*. 138(2): 160-167.
- Eriste, E., Kurrikoff, K., Suhorutšenko, J., Oskolkov, N., Copolovici, D.M., Jones, S., Laakkonen, P., Howl, J., Langel, Ü. (2013). Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2. *Bioconjug Chem*. 24(3): 305-313.
- Ezzat, K., El-Andaloussi, S., Abdo, R., Langel, Ü. (2010). Peptide-Based Matrices as Drug Delivery Vehicles. *Current Pharmaceutical Design*. 16: 1167-1178.
- Fittipaldi, A., Ferrari, A., Zoppe, M., Arcangeli, C., Pellegrini, V., Beltram, F., Giacca, M. (2003). Cell Membrane Lipid Rafts Mediate Caveolar Endocytosis of HIV-1 Tat Fusion Proteins. *J Biol Chem*. 278: 34141-34149.
- Fonseca, S.B., Pereira, M.P., Kelley, S.O. (2009). Recent advances in the use of cell-penetrating peptides for medical and biological applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 61(11): 953-964.
- Frankel, A.D., Pabo, C.O. (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell*. 55(6): 1189-1193.
- Gao, S., Kim, K-S., Liu, D. (2010). A plasmid display platform for the selection of peptides exhibiting a functional cell-penetrating phenotype. *Biotechnol Prog*. 26(6): 1796-1800.
- Gao, X., Kim, K- S., Liu, D. (2007). Nonviral Gene Delivery: What We Know and What Is Next. *The AAPS Journal*. 9(1): E92- E104.
- Heitz, F., Morris, M.C., Divita, G. (2009). Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *British Journal of Pharmacology*. 157: 195-206.

- Horton, K.L., Stewart, K.M., Fonseca, S.B., Guo, Q., Kelley, S.O. (2008). Mitochondria-penetrating peptides. *Chem Biol.* 15: 375-382.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A. (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 1864-1868.
- Järver, P., Langel, Ü. (2004). The use of cell-penetrating peptides as a tool for gene regulation. *Drug Discov Today.* 9(9): 395-402.
- Kamei, N., Morishita, M., Eda, Y., Ida, N., Nishio, R., Takayama, K., (2008). Usefulness of cell-penetrating peptides to improve intestinal insulin absorption. *J Control Release.* 132(1): 21-25
- Lehto, T., Simonson, O.E., Mäger, I., Ezzat, K., Sork, H., Copolovici, D-M., Viola, J.R., Zaghloul, E.M., Lundin, P., Moreno, P.M.D., Mäe, M., Oskolkov, N., Suhorutšenko, J., Smith, C.E., El-Andaloussi, S. (2011). A Peptide-based Vector for Efficient Gene Transfer *In Vitro* and *In Vivo*. *Molecular Therapy.* 19(8): 1457-1467.
- Lindgren, M., Langel, Ü. (2011). Classes and Prediction of Cell-Penetrating Peptides, p 3-19. *In Ü. Langel, Cell- Penetrating Peptides- Methods in Molecular Biology*, vol 683. Humana Press. New York.
- Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sütülü, T., Johansson, H., Langel, Ü. (2007). Delivery of short interfering RNA using endosomolytic cell-penetrating peptides. *FASEB J.* 21: 2664-2671.
- Lundberg, P., Langel, Ü. (2003). A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recoqnit.* 16: 227-233.
- Mehir-Humbert, S., Guy, R.H. (2005). Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev.* 57(5): 733-753.
- Melamed, M.R., Kamentsky, L.A., Boyse, E.A. (1969). Cytotoxic test automation: a live-dead cell differential counter. *Science*, 163: 285-286.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J Am Chem Soc*, 85(14): 2149-2154.
- Michl, J., Scharf, B., Schmidt, A., Huynh, C., Hannan, R., von Gizycki, H., Friedman, F.K., Brandt-Rauf, P., Fine, R.L., Pincus, M.R. (2006). PNC-28, a p53-derived peptide that is

- cytotoxic to cancer cells, blocks pancreatic cancer cells growth in vivo. *Int J Cancer*. 119: 1577-1585.
- Mueller, J., Kretzschmar, I., Volkmer, R., Boisguerin, P. (2008). Comparison of Cellular Uptake Using 22 CPPs in 4 Different Cell Lines. *Bioconjug Chem*. 19(12): 2363-2374.
- Mäe, M., El-Andaloussi, S., Lehto, T., Langel, Ü. (2009). Chemically modified cell-penetrating peptides for the delivery of nucleic acids. *Expert Opin Drug Deliv*. 6(11): 1195-1205.
- Mäe, M., Langel, Ü. (2006). Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol*. 6(5): 509-514.
- Oskolkov, N., Arukuusk, P. Copolovici, D-M., Lindberg, S., Margus, H., Padari, K., Pooga, M., Langel, Ü. (2011). NickFects, Phosphorylated Derivatives of Transportan 10 for Cellular Delivery of Oligonucleotides. *Int J Pept Ther*. 17: 147-157.
- Pan, C., Xu, S., Zhou, H., Fu, Y., Ye, M., Zou, H. (2007). Recent developments in methods and technology for analysis of biological samples by MALDI-TOF-MS. *Anal Bioanal Chem*. 387: 193- 204.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., Langel, Ü.(1998). Cell penetration by transportan. *The FASEB J*. 12(1): 67-77.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., Chernomordik, L.V. (2005). Cellular Uptake of Unconjugated TAT Peptide Involves Clathrin-dependent Endocytosis and Heparan Sulfate Receptors. *J Biol Chem*. 280: 15300-15306.
- Saar, K., Lindgren, M., Hansen, M., Eiriksodottir, E., Jiang, Y., Rosenthal-Aizman, K., Sassian, M., Langel, Ü. (2005). Cell-penetrating peptides: A comparative membrane toxicity study. *Anal Biochem*. 345: 55-65.
- Smolewski, P., Grabarek, J. Halicka, H.D., Darzynkiewicz, Z. (2002). Assay of caspase activation in situ combined with probing plasma membrane integrity to detect three distinct stages of apoptosis. *J Immunol Methods*. 265: 111-121.
- Soomets, U., Lindgren, M., Gallet, X., Hällbrink, M., Elmquist, A., Balaspiri, L., Zorko, M., Pooga, M., Brasseur, R., Langel, Ü. (2000). Deletion analogues of transportan. *Biochim Biophys Acta*. 1467(1): 165-176.

- Stewart, K.M., Horton, K.L., Kelley, S.O. (2008). Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Org Biomol Chem.* 6: 2242-2255.
- Ziegler, A., (2008). Thermodynamic studies and binding mechanisms of cell-penetrating peptides with lipids and glycosaminoglycans. *Adv Drug Deliv Rev.* 60(4-5): 580-597.
- Wadia, J.S., Stan, R.V., Dowdy, S.F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med.* 10: 310-315.
- Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., Rothbard, J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 13003-13008.

Tänuavaldused

Soovin siiralt tänada oma juhendajaid, Piret Arukuuske ja Ülo Langelit abivalmiduse, lahete nõuannete ja asjakohase kriitika eest. Samuti tahan tänada kõiki laborikaaslaseid abi ja sõbraliku õhkkonna loomise eest.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Looa Laan
(sünnikuupäev: 29.03.1991)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „Rakku sisenevad peptiidid L1 ja L2 plasmiidse DNA transporteritena“, mille juhendajad on Piret Arukuusk ja Ülo Langel,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2013